



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : <b>A61K 39/385, 39/39, A61P 31/00, 35/00, 37/00</b>		<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/27432</b>
		(43) Date de publication internationale: 18 mai 2000 (18.05.00)	
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02734		(81) Etats désignés: AU, BR, CA, CN, JP, MX, US, ZA, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Date de dépôt international: 8 novembre 1999 (08.11.99)			
(30) Données relatives à la priorité: 98/14007 6 novembre 1998 (06.11.98) FR		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>	
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PIERRE FABRE MEDICAMENT [FR/FR]; 45, place Abel Gance, F-92100 Boulogne-Billancourt (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BONNEFOY, Jean-Yves [FR/FR]; Les Noyers, F-74350 Le Sappey (FR). LECOANET, Sybille [CH/CH]; 41, A1 Résidence du Golf, CH-1196 Gland (CH). AUBRY, Jean-Pierre [FR/FR]; 60, chemin des Crêts des Crêts, F-74350 Cuvat (FR). JEANNIN, Pascale [FR/FR]; 135, chemin de Révule, F-01220 Divonne-les-Bains (FR). BAUSSANT, Thierry [FR/FR]; 35, rue Jean Jaurès, F-01200 Bellegarde (FR).			
(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).			
(54) Title: USE OF AN ENTEROBACTERIUM PROTEIN OmpA FOR SPECIFIC TARGETING TOWARDS ANTIGEN-PRESENTING CELLS			
(54) Titre: UTILISATION D'UNE PROTEINE OmpA D'ENTEROBACTERIE, POUR LE CIBLAGE SPECIFIQUE VERS LES CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENES			
(57) Abstract			
<p>The invention concerns the use of an enterobacterium protein OmpA, preferably <i>Klebsiella pneumoniae</i> P40 protein, for specific targeting of a biologically active substance associated therewith towards antigen-presenting cells, in particular human dendritic cells. The invention also concerns the use of the OmpA protein for preparing a pharmaceutical composition for preventing and/or treating diseases, in particular cancers related to a tumour-associated antigen, autoimmune diseases or infectious diseases.</p>			
(57) Abrégé			
<p>L'invention concerne l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie, de préférence la protéine P40 <i>klebsiella pneumoniae</i>, pour le ciblage spécifique d'une substance biologiquement active qui lui est associée vers les cellules présentatrices d'antigènes, notamment les cellules dendritiques humaines. L'invention a également pour objet l'utilisation de la protéine OmpA pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la prévention et/ou le traitement de maladies, notamment les cancers associés à un antigène tumoral, les maladies auto-immunes ou les maladies infectieuses.</p>			

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## UTILISATION D'UNE PROTEINE OmpA D'ENTEROBACTERIE, POUR LE CIBLAGE SPECIFIQUE VERS LES CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENES

5 L'invention concerne l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie, de préférence la protéine P40 *Klebsiella pneumoniae*, pour le ciblage spécifique d'une substance biologiquement active qui lui est associée vers les cellules présentatrices d'antigènes, notamment les cellules dendritiques humaines. L'invention a également pour objet l'utilisation de la protéine OmpA pour la préparation d'une composition  
10 pharmaceutique destinée à la prévention et/ou le traitement de maladies, notamment les cancers associés à un antigène tumoral; les maladies auto-immunes ou les maladies infectieuses.

La vaccination est un moyen efficace de prévenir ou réduire les infections virales ou bactériennes. Le succès des campagnes de vaccination dans ce domaine a  
15 permis d'étendre le concept de vaccin dans d'autres domaines tels que celui du cancer et des maladies auto-immunes. En ce qui concerne par exemple certaines formes de cancer, l'inefficacité de thérapies classiques et/ou leurs effets secondaires, comme la chimio- ou la radiothérapie, a motivé la recherche de thérapie alternative. Ainsi, les antigènes tumoraux spécifiques exprimés à la surface des cellules tumorales peuvent  
20 être utilisés comme cible en immunothérapie pour l'élimination de ces cellules. Un des problèmes majeurs couramment rencontrés pour la préparation de ces vaccins est que les antigènes vaccinaux lorsqu'ils sont administrés seuls chez l'hôte, ne sont pas assez immunogéniques pour induire une réponse immunitaire suffisamment efficace pour conférer la protection recherchée. Ces antigènes sont ainsi souvent couplés de  
25 manière covalente à une molécule porteuse telle que par exemple épitope de la toxine diphtérique, l'anatoxine tétanique (TT), un antigène de surface du virus de l'hépatite B, l'antigène VP1 du virus de la poliomyélite ou tout autre toxine ou antigène viral ou bactérien tel que des protéines antigéniques issues de la membrane externe d'entérobactérie qui ont la propriété de potentialiser la réponse immunitaire (humorale  
30 et cellulaire) de l'antigène qui lui est associée comme la protéine OmpA nommée P40 issue de *Klebsiella pneumoniae* (décrite dans les demandes internationales de brevet WO 95/27787 et WO 96/14415). Néanmoins, dans la plupart des cas un autre composant s'est avéré nécessaire pour augmenter l'efficacité du vaccin, et actuellement le seul adjuvant autorisé chez l'homme est l'Alum.

Grâce à l'immunologie, il a été récemment découvert que les cellules dendritiques (CD) jouaient un rôle majeur dans le système immunitaire. Ces cellules, dérivées des cellules souches de la moelle osseuse, sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles impliquées dans la réponse immune primaire spécifique d'un antigène (Peters J. et al., 1996). Elles ingèrent ou internalisent les antigènes et présentent les fragments de ces antigènes à des cellules T naives. Cette ingestion induit à la surface des cellules dendritiques l'expression de molécules de costimulation telles le CD80 et le CD86. Ces molécules permettent une interaction étroite avec les cellules T (Girolomoni G. et Ricciardi-Castagnoli P., 1997, Immunol. Today, 18, 102-104). Les cellules dendritiques sont distribuées de manière diffuse dans les tissus. Elles sont retrouvées aux niveaux de la peau et des organes lymphoïdes (Hinrich J. et al., 1996, Immunol. Today, 17, 273-277).

Grâce à leur efficacité à présenter les antigènes et à stimuler le système immunitaire, les cellules dendritiques ont été utilisées pour générer des réponses cytotoxiques CTL antivirales (Ludewig B. et al., 1998, J. Virol., 72, 3812-3818 ; Brossard P. et al., 1997, J. Immunol., 158, 3270-3276) ou anticancéreuses (Nestle F.O. et al., 1998, Nat. Med., 4, 328-332). Les approches ont consisté à charger les cellules dendritiques *ex vivo* avec l'antigène d'intérêt (peptides ou lysat cellulaire) et réimplanter ces cellules chez le patient. D'autres approches consistent à transfecter *ex vivo* les cellules dendritiques avec le gène codant pour l'antigène d'intérêt et à réinjecter ces cellules transfectées (Gilboa E. et al., 1998, Cancer Immunol. Immunother., 46, 82-87). Ces approches ont été utilisées avec succès chez la souris et récemment chez l'homme (Hsu F.J. et al., 1996, Nat. Med., 2, 52-58). Les cellules dendritiques chargées en antigènes présentent les peptides par le biais de molécules de classe I ou II et induisent l'activation des lymphocytes T CD4 ou CD8+. Par conséquent, la possibilité de diriger les antigènes désignés, tels que des protéines ou des polysaccharides, ou des vecteurs viraux capables de transférer des gènes codant pour ces antigènes vers les cellules dendritiques permettrait d'améliorer l'efficacité de la stimulation du système immunitaire. De plus, le ciblage spécifique des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), notamment les cellules dendritiques, permettrait d'éviter les étapes de prélèvement, de purification, de traitement *ex vivo* de cellules CPA autologues ou hétérologues avec les antigènes tumoraux ou les vecteurs viraux et la réimplantation des cellules CPA traitées.

Afin de cibler spécifiquement les cellules dendritiques avec des substances actives d'intérêt, telles que des protéines ou des vecteurs viraux capables de transférer

des gènes codant pour ces protéines d'intérêt, de nombreux travaux ont consisté à identifier des molécules qui se fixeraient préférentiellement sur les cellules dendritiques ou des récepteurs qui seraient exprimés spécifiquement sur les cellules dendritiques. Un récepteur DEC 205 impliqué dans la prise en charge de l'antigène a été identifié sur  
5 des cellules dendritiques murines (Jiang W. et al., 1995, Nature, 375, 151-155) et humaines (Kato M. et al., 1998, Immunogenetics, 47, 442-450). L'analyse de la structure de ce récepteur met en évidence des domaines de reconnaissance d'hydrates de carbone qui seraient impliqués dans la capture, l'internalisation et/ou la présentation d'antigènes portant des résidus d'hydrates de carbone. Néanmoins, les  
10 auteurs ne donnent aucune information sur les ligands pouvant être fixés par ce récepteur. D'autre part, les auteurs mentionnent que les domaines de reconnaissance d'hydrates de carbone du récepteur DEC-205 qui seraient impliqués dans la capture, l'internalisation et/ou la présentation d'antigènes (domaines riches en cystéine) sont également présents dans plus de 50 protéines dont certains récepteurs cellulaires.

15 Ainsi, il existe aujourd'hui un besoin de disposer d'un composé capable de cibler spécifiquement une cellule présentatrice d'antigène (CPA), notamment une cellule dendritique, et qui soit capable en outre d'être internalisé par ladite cellule. Un tel composé capable de se fixer spécifiquement sur ces cellules, puis d'être internalisé aurait comme avantage de pouvoir être utilisé comme composé pour le transport et le  
20 ciblage de substance biologiquement active dont l'efficacité est modulée et/ou liée à la fixation et/ou à l'internalisation de cette substance par ces cellules. D'autre part, il serait avantageux que ce composé recherché puisse être facilement associé à la substance active par couplage chimique, par couplage résultant d'une fusion génétique ou puisse être exprimé à la surface d'une cellule hôte ou encore à la surface d'une  
25 particule virale pour le transfert de gène d'intérêt dans ces cellules CPA.

Les auteurs de la présente invention ont mis en évidence de manière surprenante qu'une protéine de la membrane externe de type OmpA d'entérobactérie, notamment la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae*, est capable non seulement de se fixer spécifiquement sur une cellule CPA mais également capable d'être internalisée  
30 par ladite cellule CPA, notamment par une cellule dendritique.

Ainsi, la présente invention est relative à l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments pour le ciblage spécifique d'une substance biologiquement active qui lui est associée vers les cellules présentatrices d'antigènes.

Par cellules présentatrices d'antigènes, on entendra désigner dans la présente  
35 invention, les cellules CPA professionnelles formant partie intégrante du système

immunitaire telles que les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes B ou les monocytes.

Dans la présente invention, on entendra désigner également par le terme « protéine » les peptides ou les polypeptides et par le terme « OmpA » (pour « Outer Membrane Protéin »), les protéines de la membrane externe de type A.

Par fragment d'une protéine OmpA, on entend désigner tout fragment de séquence d'acides aminés compris dans la séquence d'acides aminés de la protéine OmpA capable de se fixer spécifiquement sur les cellules CPA, notamment les cellules dendritiques, et comprenant au moins 5 acides aminés, de préférence 10 acides aminés ou de manière plus préférée 15 acides aminés, lesdits fragments étant en outre capables d'être internalisés dans lesdites cellules CPA.

Par « substance biologiquement active », on entend désigner tout composé capable d'exercer une activité thérapeutique et dont l'activité peut être modulée par l'intermédiaire des cellules CPA. On peut citer comme exemple de telles substances biologiquement actives, mais sans s'y limiter, les composés immunogènes tels que des antigènes ou haptènes de nature protéique, poly- ou oligosaccharidique, glycoprotéique, lipoprotéique ou en général d'origine organique, ces composés immunogènes pouvant être portés par des structures complexes telles que des bactéries ou des particules virales.

Par « substance biologiquement active », on entend également désigner tout composé capable de modifier l'activité fonctionnelle des cellules CPA, en particulier leur croissance, leur différenciation ou leur système d'expression. On peut citer comme exemple de telles substances biologiquement actives, mais sans s'y limiter, les facteurs de croissance cellulaire dont les cytokines (IL-4, IL-3, GM-CSF, TNF- $\alpha$ ), les acides nucléiques codant pour des protéines d'intérêt homologues ou hétérologues et capables d'être exprimées par les cellules CPA.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie ou l'un de ses fragments se fixe spécifiquement sur les cellules présentatrices d'antigènes et en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie ou l'un de ses fragments est internalisée dans les cellules présentatrices d'antigènes.

De préférence, l'invention comprend l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont choisies parmi les cellules

dendritiques, les monocytes ou les lymphocytes B, de manière plus préférée, les cellules dendritiques.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention comprend l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue à partir d'une culture de ladite entérobactérie par un procédé d'extraction.

Les procédés d'extraction de protéines de membrane bactériennes sont connus de l'homme de l'art et ne seront développés dans la présente description. On peut citer par exemple, mais sans s'y limiter le procédé d'extraction décrit par Haeuw J.H. et al. (Eur. J. Biochem, 255, 446-454, 1998).

Dans un autre mode de réalisation préféré, l'invention comprend également l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par voie recombinante.

Les méthodes de préparation de protéines recombinantes sont aujourd'hui bien connues de l'homme de l'art et ne seront pas développées dans la présente description, on pourra néanmoins se référer à la méthode décrite dans les exemples. Parmi les cellules utilisables pour la production de ces protéines recombinantes, il faut citer bien entendu les cellules bactériennes (Olins P.O. et Lee S.C., 1993, Recent advances in heterologous gene expression in E. coli. Curr. Op. Biotechnology 4:520-525), mais également les cellules de levure (Buckholz R.G., 1993, Yeast Systems for the Expression of Heterologous Gene Products. Curr. Op. Biotechnology 4:538-542), de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de mammifère (Edwards C.P. et Aruffo A., 1993, Current applications of COS cell based transient expression systems. Curr. Op. Biotechnology 4:558-563) mais également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant en oeuvre des baculovirus par exemple (Luckow V.A., 1993, Baculovirus systems for the expression of human gene products. Curr. Op. Biotechnology 4:564-572).

De manière tout à fait préférée, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que ladite entérobactérie est *Klebsiella pneumoniae*.

En particulier, l'invention est relative à l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la séquence d'acides aminés de ladite protéine OmpA de *Klebsiella pneumoniae*, ou l'un de ses fragments, comprend :

a) la séquence d'acides aminés d séquence SEQ ID N° 2 ;

- b) la séquence d'acides aminés d'une séquence présentant une homologie d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 85 %, 90 % ou 95 % avec la séquence SEQ ID N° 2 ; ou
- c) la séquence d'acides aminés d'un fragment d'au moins 5 acides aminés d'une séquence telle que définie en a) ou b).

Par séquence présentant une homologie d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 85 %, 90 % ou 95 % avec la séquence de référence SEQ ID N° 2, on entend désigner une séquence d'acides aminés présentant un degré d'identité après alignement optimal respectivement d'au moins 80 %, 85 %, 90 % ou 95 % avec la séquence de référence SEQ ID N° 2, ladite séquence homologue ou l'un de sesdits fragments d'au moins 5 acides aminés tels que définis précédemment en c) étant caractérisés en ce qu'ils se fixent spécifiquement sur les cellules présentatrices d'antigènes et, le cas échéant, en ce qu'ils sont internalisés dans les cellules présentatrices d'antigènes.

Par « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de nucléotides ou de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. Le meilleur alignement ou alignement optimal est l'alignement pour lequel le pourcentage d'identité entre les deux séquences à comparer, comme calculé ci-après, est le plus élevé. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison » pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Needleman et Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444], au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, ou encore BLASTN ou BLASTX, Altschul et al., J. Mol. Biol. 215,403,1990).



Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière optimale par fenêtre de comparaison dans laquelle la région de la séquence d'acide nucléique ou d'acides aminés à comparer peut comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

L'invention comprend en outre l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est choisie parmi les protéines ou les peptides, les lipopeptides, les polysaccharides, les oligosaccharides, les acides nucléiques, les lipides et les substances chimiques.

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est couplée par liaison covalente avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments, notamment par un couplage chimique.

Dans un mode de réalisation particulier, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce qu'il est introduit un ou plusieurs éléments de liaison dans ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et/ou de ladite substance biologiquement active pour faciliter le couplage chimique, de préférence ledit élément de liaison introduit est un acide aminé.

Selon l'invention, il est possible d'introduire un ou plusieurs éléments de liaison, notamment des acides aminés pour faciliter les réactions de couplage entre la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et la substance biologiquement active, telle qu'un antigène ou un haptène. Le couplage covalent entre la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et la substance biologiquement active, telle qu'un antigène ou un haptène selon l'invention peuvent être réalisés à l'extrémité N- ou C- terminale de la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments. Les réactifs bifonctionnels permettant ce couplage seront déterminés en fonction de l'extrémité de la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, choisie pour effectuer le couplage et de la nature de la substance biologiquement active à coupler.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active couplée par liaison

covalente avec ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, est une protéine chimérique recombinante résultante de l'expression d'une construction d'acide nucléique codant pour ladite substance biologiquement active et pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments.

5 Les conjugués issus d'un couplage à ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, peuvent être préparés par recombinaison génétique. La protéine chimérique ou hybride (conjugué) peut être produite par des techniques d'ADN recombinant par insertion ou addition à la séquence d'ADN codant pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, d'une séquence codant pour ladite substance  
10 biologiquement active de nature protéique.

Les procédés de synthèse des molécules hybrides englobent les méthodes utilisées en génie génétique pour construire des polynucléotides hybrides codant pour les séquences polypeptidiques recherchées. On pourra, par exemple, se référer  
15 avantageusement à la technique d'obtention de gènes codant pour des protéines de fusion décrite par D.V. Goeddel (Gene expression technology, Methods in Enzymology, vol. 185, 3-187, 1990).

L'invention concerne tout particulièrement l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est un antigène ou un haptène.

20 Sous un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention pour moduler la réponse immune vis-à-vis d'un antigène ou d'un haptène, de préférence pour améliorer la réponse immune vis-à-vis d'un antigène ou d'un haptène.

L'invention comprend également l'utilisation d'une protéine OmpA  
25 d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter une maladie par une substance active dont l'efficacité est modulée et/ou liée à son internalisation par des cellules présentatrices d'antigènes, de préférence par des cellules dendritiques.

De préférence, l'utilisation selon l'invention est relative à la préparation d'une  
30 composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter les cancers, de préférence les cancers associés à un antigène tumoral, les maladies auto-immunes, les allergies, les rejets de greffes, les maladies cardiovasculaires, les maladies du système nerveux central, les maladies inflammatoires, les maladies infectieuses ou les maladies liées à une immunodéficience.

L'invention a en particulier pour objet l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique vaccinale destinée à prévenir ou à traiter une maladie infectieuse ou un cancer associé à un antigène tumoral.

5 L'invention comprend en outre l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique comprend en outre un adjuvant favorisant la réponse immune, tel que l'Alum.

L'invention comprend également l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous une forme permettant  
10 d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité, notamment sous la forme d'un liposome, d'un vecteur viral ou d'une cellule hôte transformée capable d'exprimer une protéine chimérique recombinante résultante de l'expression d'une construction d'acide nucléique codant pour ladite substance biologiquement active et pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments.

15

Les légendes des figures et exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

Légendes des figures :

20

Figure 1 : Fixation de rP40-Alexa sur différents types cellulaires.

Après incubation de rP40-Alexa sur différents types cellulaires, la fixation spécifique de rP40-Alexa (trait gras) est mesurée par cytométrie en flux. La fixation d'une protéine non relevante (glycophorine) est représentée en trait fin.

25 Figure 2 : Influence de la concentration de rP40 sur la fixation sur les cellules dendritiques.

Figure 3 : Inhibition de la fixation de rP40-Alexa par rP40 non marquée sur des cellules dendritiques.

Après incubation de cellules dendritiques avec différentes concentrations de rP40 non  
30 marquée, rP40-Alexa est ajoutée. La fixation de rP40-Alexa est quantifiée par cytométrie en flux.

Figure 4 : Evaluation de la fixation de différentes protéines marquées sur les cellules dendritiques.

Des protéines porteuses P40, TT (anatoxique tétanique) et BB (dérivées de la protéine  
35 G du streptocoque) marquées à l'Alexa sont incubées avec des cellules dendritiques

(trait plein). Une protéine non relevante est utilisée comme témoin négatif (trait fin). La fixation est mesurée par cytométrie en flux.

Figures 5A et 5B : Internalisation de rP40-Alexa dans les cellules dendritiques.

Après incubation de cellules dendritiques avec rP40-Alexa à 4°C (panel gauche, figure 5A) ou à 37°C (panel droit, figure 5B), les cellules sont observées par microscopie confocale (grossissement x 220).

#### Exemple 1 : Clonage du gène rP40

Le gène codant pour la protéine recombinante P40 nommée rP40 a été obtenu par amplification par PCR à partir de l'ADN génomique de *Klebsiella pneumoniae* IP 1145 (Nguyen et col., Gene, 1998). Le fragment de gène codant de rP40 est inséré dans divers vecteurs d'expression, en particulier un vecteur sous le contrôle du promoteur de l'opéron Trp. La séquence d'acides aminés de la protéine rP40 et la séquence nucléotidique codant pour la protéine P40 sont représentées respectivement par les séquences SEQ ID N° 2 et SEQ ID N° 1 dans la liste des séquences ci-après.

Une souche productrice *E. coli* K12, a été transformée par un vecteur d'expression pvaLP40. La protéine rP40 est produite sous forme de corps d'inclusion avec un rendement important (> 10 %, g de protéines/g de biomasse sèche). Cet exemple n'est qu'une illustration de l'expression de la rP40, mais elle peut être étendue à d'autres souches bactériennes ainsi que d'autres vecteurs d'expression.

#### Exemple 2 : Procédé de fermentation de protéines de fusion rP40

Un erlenmeyer contenant 250 ml de milieu TSB (Tryptic Soy Broth, Difco) renfermant de l'Ampicilline (100 µg/ml, Sigma) et de la Tétracycline (8 µg/ml, Sigma) est inoculé avec la souche *E. coli* recombinante décrite ci-dessus. L'incubation est réalisée pendant une nuit à 37°C puis 200 ml de cette culture est utilisée pour ensemer 2 litres de milieu de culture dans un fermenteur (Biolafitte, France). De manière assez classique, le milieu de culture peut être composé d'agents chimiques, supplémentés par les vitamines, des extraits de levure, connus pour avoir une croissance à densité élevée de cellules bactériennes.

Les paramètres contrôlés durant la fermentation sont : le pH, l'agitation, la température, le taux d'oxygénation, l'alimentation de sources combinées (Glycérol ou Glucose). De manière générale, le pH est régulé à 7,0, la température est fixée à 37°C. La croissance est contrôlée en alimentant en glycérol (87 %) à un débit constant (12 ml/h) pour maintenir le signal de tension de l'oxygène dissous à 30 %. Lorsque la

turbidité de la culture (mesurée à 580 nm) atteint la valeur de 80 (après environ 24 heures de culture), la production des protéines est déclenchée par addition de l'acide indole acrylique (IAA) à la concentration finale de 25 mg/l. Environ 4 heures après induction, les cellules sont récoltées par centrifugation. La quantité de biomasse humide obtenue est d'environ 200 g.

### Exemple 3 : Procédé d'extraction et de purification de la protéine rP40

#### Extraction de la rP40

Après centrifugation du bouillon de culture (4000 rpm, 10 min, 4°C), les cellules sont remises en suspension dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,5. Les insolubles ou corps d'inclusion sont obtenus après un traitement par le lysozyme (0,5 g/litre, 1 heure température ambiante / agitation douce). Le culot de corps d'inclusion obtenu par centrifugation (15 min à 10 000 g à 4°C) est repris dans un tampon Tris-HCl 25 mM à pH 8,5 et 5 mM MgCl<sub>2</sub>, puis centrifugé (15 min à 10 000 g).

On solubilise les corps d'inclusion à 37°C pendant 2 heures dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,5 contenant 7 M urée (agent dénaturant) et 10 mM Dithiothréitol (réduction des ponts disulfures). Une centrifugation (15 min à 10 000 g) permet d'éliminer les particules non solubles.

On resuspend ensuite dans 13 volumes de tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,5 contenant du NaCl (8,76 g/l) et du Zwittergent 3-14 (0,1 %, p/v). La solution est laissée pendant une nuit à température ambiante sous agitation douce au contact de l'air (favoriser la renaturation de la protéine par dilution et réoxydation des ponts disulfures).

#### Purification de la protéine rP40

Etape de chromatographie d'échange d'anions.

Après une nouvelle centrifugation, la solution est dialysée contre un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,5 contenant 0,1 % Zwittergent 3-14 (100 X volumes de tampon) pendant une nuit à 4°C.

Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur d'anions forts (gel Biorad Macro Prep High Q) équilibrée dans le tampon décrit ci-dessus à un débit linéaire de 15 cm/h. Les protéines sont détectées à 280 nm. La protéine rP40 est éluée, avec un débit linéaire de 60 cm/h, pour une concentration de 0,2 M en NaCl dans le tampon TrisHCl 25 mM, pH 8,5 ; 0,1 % Zwittergent 3-14.

### Etape de chromatographie d'échange de cations

Les fractions contenant la protéine rP40 sont poolées et concentrées par ultrafiltration à l'aide d'un système de cellule à agitation Amicon utilisé avec une membrane Diaflo de type YM10 (seuil de coupure 10 kDa) pour des volumes de l'ordre  
5 de 100 ml, ou à l'aide d'un système de filtration à flux tangentiel Minitan Millipore utilisé avec des plaques de membranes possédant un seuil de coupure 10 kDa pour des volumes supérieurs. La fraction ainsi concentrée est dialysée pendant une nuit à 4°C contre un tampon citrate 20 mM pH 3,0, à 0,1 % de Zwittergent 3-14.

Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type  
10 échangeur de cations forts (gel Biorad Macro Prep High S) équilibrée dans le tampon citrate 20 mM pH 3,0, à 0,1 % de Zwittergent 3-14. La protéine rP40 est éluée (vitesse 61 cm/h) pour une concentration 0,7 M en NaCl. Les profils électrophorétiques montrent un degré de pureté de l'ordre de 95 %. L'état de la protéine est suivi par SDS-PAGE. Selon sa forme dénaturée ou native, la protéine P40 extraite de la membrane  
15 de *Klebsiella pneumoniae* possède un comportement électrophorétique (migration) caractéristique. La forme native (structure en feuillets  $\beta$ ) présente en effet une masse moléculaire plus faible que la forme dénaturée (structure en hélices  $\alpha$ ) sous l'action d'un agent dénaturant, tel que l'urée ou le chlorhydrate de guanidine, ou par chauffage à 100°C en présence de SDS). La protéine rP40 n'est pas correctement renaturée en  
20 fin de renaturation, que celle-ci soit réalisée en absence ou en présence de 0,1 % ; (p/v) Zwittergent 3-14. Par contre, une renaturation totale est obtenue après dialyse contre un tampon Tris/HCl 25 mM pH 8,5 contenant 0,1 % (p/v) de Zwittergent 3-14. Toutefois, il faut noter que cette renaturation n'est obtenue que lorsque l'étape de dilution et le traitement à température ambiante sont réalisés eux-mêmes en présence  
25 de Zwittergent 3-14 (résultats négatifs en absence de détergent).

**Exemple 4 :** Fixation spécifique de rP40 sur les cellules présentatrices d'antigène (CPA). Méthodologie

### Purification des lymphocytes T humains

30 Les cellules mononucléées (CMN) sont isolées à partir du sang périphérique de volontaires sains par centrifugation (1800 rpm, 20 min, température ambiante), sur un gradient de Ficoll. Après centrifugation, les CMN, situées à l'interface ficoll/plasma, sont récoltées et lavées 2 fois avec du milieu de culture complet (MC) (RPMI 1640 + 10 % SVF + L-glutamine + antibiotique). Les lymphocytes T sont alors isolés par la  
35 technique du rosetting qui utilise leur capacité à se fixer aux globules rouges de

mouton (GRM). Brièvement, les CMN sont incubées avec des GRM pendant 1 heure à 4°C. Après centrifugation sur gradient de ficoll, les lymphocytes B et les monocytes sont situés à l'interface alors que les lymphocytes T fixés aux GRM sont dans le culot cellulaire. Après récupération du culot cellulaire et lyse des GRM avec une solution saline hypotonique, la pureté des lymphocytes T est appréciée par cytométrie en flux avec un anticorps anti-CD3 et est supérieure à 95 %.

#### Purification des monocytes humains

Les monocytes sont purifiés à partir des CMN par sélection positive en utilisant la technologie MACS (Magnetic Activated Cell Sorter). Les CMN sont marquées avec un anticorps anti-CD14 couplé à des particules magnétiques puis passées sur une colonne aimantée. Les monocytes sur lesquels sont fixés les complexes anticorps-colloïde restent dans la colonne alors que les cellules n'ayant pas fixé l'anticorps sont éluées par lavages successifs. Ensuite les monocytes sont décrochés en effectuant des lavages en absence d'aimant. La pureté de la fraction collectée est supérieure à 98 %.

#### Génération de cellules dendritiques humaines (CD) à partir de monocytes

Les monocytes purifiés sont cultivés à la concentration de 106/ml dans du MC pendant 6 à 7 jours en présence de IL 4 (20 ng/ml) et de GMCSF (20 ng/ml). Les CD générées à ce stade sont des CD immatures qui expriment le CD1a et pas ou peu le CD83. Leur phénotype est vérifié par la technique de cytométrie en flux.

#### Purification des lymphocytes B humains à partir d'amygdales

Les amygdales sont broyées et les cellules récoltées sont déposées sur un gradient de ficoll. Les CMN recueillies à l'interface sont lavées puis incubées avec des GRM. Après ficoll, les lymphocytes B sont situés à l'interface alors que les lymphocytes T fixés aux GRM sont dans le culot cellulaire. Les lymphocytes B sont alors lavés. Leur pureté, vérifiée par cytométrie en flux, est supérieure à 96%.

#### Culture des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires RPMI 8866, DAUDI, HL60 et Jurkat sont cultivées dans du MC.

#### Couplage de rP40 au fluorochrome Alexa488

La concentration de la protéine rP40 est ajustée à 2 mg/ml dans du PBS. A 500 µl de la protéine sont ajoutés 50 µl de bicarbonate de sodium à 1 M. La solution est alors transférée dans un tube de réaction contenant le colorant Alexa488 et le couplage s'effectue à température ambiante. Après 1 h, la réaction de couplage est

arrêtée par ajout de 15 µl d'hydroxylamine. La protéine marquée est séparée du colorant libre par purification sur colonne.

La quantité de rP40 marquée à l'Alexa488 est ensuite estimée par dosage colorimétrique.

- 5 - Etude de la fixation de P40-Alexa488 sur les différentes cellules par cytométrie en flux.

Pour chaque marquage, 200 000 cellules sont lavées avec du tampon FACS (PBS + 1 % BSA + 0,01 % azide de sodium) et resuspendues, dans une plaque 96 puits à fond conique, dans 50 µl de tampon FACS. La protéine P40-Alexa488 ou la  
10 protéine contrôle (glycophorine-Alexa488) sont alors ajoutées à  $10^{-6}$ M pendant environ 1 heure à 4°C. Après incubation, les cellules sont alors lavées 3 fois avec du tampon FACS puis resuspendues dans 200 µl de ce même tampon et analysées par cytométrie en flux.

#### Résultat

15 La protéine rP40 se fixe sélectivement sur les CPA humaines telles que :

- les monocytes issus du sang périphérique,
- les cellules dendritiques générées à partir des monocytes du sang périphérique,
- les lymphocytes B issus d'amygdale, les lignées lymphocytaires B : DAUDI et RPMI 8866 (cf. Fig. 1) et les lymphocytes B issus du sang périphérique (résultat non  
20 présenté).

Aucune fixation n'est observée sur des cellules qui ne possèdent pas la capacité de présenter des antigènes tels que des lymphocytes T du sang périphérique non activés, la lignée lymphocytaire T Jurkat non activée et la lignée monocyttaire HL60 non activée.

25

#### **Exemple 5 : La fixation de rP40 aux CD est spécifique**

1) La fixation de rP40 aux CD est dépendante de la dose.

#### Méthode

200 000 CD sont lavées avec du tampon FACS et incubées dans 50 µl de  
30 tampon en présence de différentes concentrations de rP40 (de  $10^{-10}$  à  $5 \times 10^{-6}$  M) pendant environ 1 heure à 4°C. Après incubation, les cellules sont lavées 3 fois avec du tampon FACS puis resuspendues dans 50 µl de ce même tampon contenant 5 µg/ml d'un anticorps polyclonal de lapin anti-P40 ou d'un anticorps IgG de lapin contrôle. Après 20 minutes d'incubation, les cellules sont relavées et incubées dans  
35 100 µl de tampon FACS contenant un anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de lapin



marqué à la fluorescéine (dilué au 1:200). Après 20 minutes d'incubation, les cellules sont lavées, reprises dans du tampon FACS et analysées par cytométrie en flux.

#### Résultat

La fixation de rP40 au CD est significative à partir de  $10^{-7}$  M ( $p < 0.001$ ) et maximale à  $2 \times 10^{-6}$  M (cf. Fig. 2).

2) La protéine rP40 non marquée diminue la fixation de rP40 Alexa488 aux CD.

#### Méthode

Afin de démontrer la spécificité de la fixation de P40, une compétition entre rP40-Alexa488 et rP40 non marquée a été réalisée. Les CD ont été incubées 10 minutes avec  $5 \times 10^{-8}$  à  $2 \times 10^{-6}$  M de rP40 non marqué puis P40-Alexa488 (utilisé à  $2 \times 10^{-6}$  M) a été ajouté. Après 20 minutes d'incubation à 4°C, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux comme décrit auparavant.

#### Résultat

La protéine rP40 non marquée inhibe de manière dépendante de la dose la fixation de  $2 \times 10^{-6}$  M de P40 Alexa488 (à plus de 60 % lorsqu'il est utilisé à  $2 \times 10^{-6}$  M) (cf. Fig. 3).

**Exemple 6 :** Parmi les protéines porteuses, TT, BB et rP40, seule la protéine rP40 se fixe aux CD.

#### Méthode

Les protéines porteuses, anatoxine tétanique (TT) et BB (d'origine de la protéine G du Streptocoque ayant une affinité à l'albumine humaine), ainsi que la protéine rP40 et la protéine contrôle glycophorine A ont été marquées par Alexa488 comme précédemment décrit. La fixation de ces molécules sur les CD a été évaluée par cytométrie en flux comme décrit auparavant. Brièvement, 200 000 CD sont lavées avec du tampon FACS et incubées dans 50 µl de tampon en présence de  $10^{-6}$  M de chacune des protéines marquées par Alexa488 pendant environ 1 heure à 4°C. Après incubation, les cellules sont lavées 3 fois avec du tampon FACS puis resuspendues dans 200 µl de ce même tampon et analysées par cytométrie en flux.

#### Résultat

A la concentration de  $10^{-6}$  M, seule rP40 se fixe aux cellules dendritiques. Aucune fixation de TT, BB et glycophorine n'est détectée (cf. Fig. 4).

**Exemple 7 :** rP40 est internalisée par les CD

#### Méthode

200 000 CD sont lavées avec du tampon PBS-BSA 1 % et resuspendues, dans une plaque 96 puits à fond conique, dans 50 µl de tampon PBS-BSA (tampon phosphate salin - sérum albumine bovine). La protéine rP40-Alexa488 ou la protéine glycophorine-Alexa488 est alors ajoutée à  $2 \times 10^{-6}$  M. Une cinétique d'internalisation est effectuée en incubant les cellules avec les protéines marquées à l'Alexa, à 37°C, de 15 minutes à 2 heures. Un contrôle négatif d'internalisation est réalisé dans les mêmes conditions en changeant les paramètres suivants : ajout d'azide de sodium 0,01 % au tampon PBS-BSA et incubation des cellules à 4°C avec les protéines marquées à l'Alexa.

Après incubation, les cellules sont alors lavées 3 fois avec du tampon PBS-BSA, resuspendues dans 100 µl de ce même tampon puis cytocentrifugées sur des lames de microscope. Les lames sont ensuite analysées par microscopie confocale.

#### Résultat

L'observation des cellules incubées à 37°C avec rP40-Alexa montre un marquage intracytoplasmique détectable dès 30 minutes et toujours observé après 2 h d'incubation : un résultat représentatif, obtenu après 1 h d'incubation à 37°C est présenté dans la Figure 5B. Un marquage membranaire mais pas intracytoplasmique est observé lorsque les cellules sont incubées à 4°C avec rP40 (cf. Fig. 5A), alors qu'aucun marquage n'est observé en présence de glycophorine-Alexa (après incubation à 4°C comme à 37°C). L'exemple d'Alexa, molécule chimique, démontre que toute molécule chimique couplée à P40 peut ainsi être délivrée aux cellules présentatrices d'antigènes y compris les cellules dendritiques.

## REVENDICATIONS

1. Utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au ciblage spécifique d'une substance biologiquement active qui lui est associée vers les cellules présentatrices d'antigènes.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie ou l'un de ses fragments se fixe spécifiquement sur les cellules présentatrices d'antigènes.

3. Utilisation selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie ou l'un de ses fragments est internalisée dans les cellules présentatrices d'antigènes.

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont choisies parmi les cellules dendritiques, les monocytes ou les lymphocytes B.

5. Utilisation selon la revendications 4, caractérisée en ce que lesdites cellules présentatrices d'antigènes sont les cellules dendritiques.

6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue à partir d'une culture de ladite entérobactérie par un procédé d'extraction.

7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par voie recombinante.

8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ladite entérobactérie est *Klebsiella pneumoniae*.

9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que la séquence d'acides aminés de ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, comprend :

- a) la séquence d'acides aminés de séquence SEQ ID N° 2 ;
- b) la séquence d'acides aminés d'une séquence présentant une homologie d'au moins 80 % avec la séquence SEQ ID N° 2 ; ou
- c) la séquence d'acides aminés d'un fragment d'au moins 5 acides aminés d'une séquence telle que définie en a) ou b).

10. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est choisie parmi les peptides, les lipopeptides,

les polysaccharides, les oligosaccharides, les acides nucléiques, les lipides et les substances chimiques.

11. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est couplée par liaison covalente avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments.

12. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que le couplage par liaison covalente est un couplage chimique.

13. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'il est introduit un ou plusieurs éléments de liaison dans ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et/ou de ladite substance biologiquement active pour faciliter le couplage chimique.

14. Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que ledit élément de liaison introduit est un acide aminé.

15. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active couplée par liaison covalente avec ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, est une protéine chimérique recombinante résultante de l'expression d'une construction d'acide nucléique codant pour ladite substance biologiquement active et pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments.

16. Utilisation selon l'une des revendications 10 à 15, caractérisée en ce que ladite substance biologiquement active est un antigène ou un haptène.

17. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 16, pour moduler la réponse immune vis-à-vis d'un antigène ou d'un haptène.

18. Utilisation selon la revendication 17, pour améliorer la réponse immune vis-à-vis d'un antigène ou d'un haptène.

19. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 18, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter une maladie par une substance active dont l'efficacité est modulée et/ou liée à son internalisation par des cellules présentatrices d'antigènes.

20. Utilisation selon la revendication 19, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter une maladie par une substance active dont l'efficacité est modulée et/ou liée à son internalisation par des cellules dendritiques.

21. Utilisation selon l'une des revendications 19 et 20, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à traiter les cancers, de préférence les cancers associés à un antigène tumoral; les maladies auto-immunes,

les allergies, les rejets de greffes, les maladies cardiovasculaires, les maladies du système nerveux central, les maladies inflammatoires, les maladies infectieuses ou les maladies liées à une immunodéficience.

22. Utilisation selon la revendication 21, pour la préparation d'une  
5 composition pharmaceutique vaccinale destinée à prévenir ou à traiter une maladie infectieuse ou un cancer associé à un antigène tumoral.

23. Utilisation selon l'une des revendications 19 à 22, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique comprend en outre un adjuvant de l'immunité.

24. Utilisation selon l'une des revendications 19 à 23, caractérisée en ce  
10 que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité.

25. Utilisation selon la revendication 24, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous la forme d'un liposome, d'un vecteur viral ou d'une cellule hôte transformée capable d'exprimer une protéine chimérique  
15 recombinante résultante de l'expression d'une construction d'acide nucléique codant pour ladite substance biologiquement active et pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments.

1/4

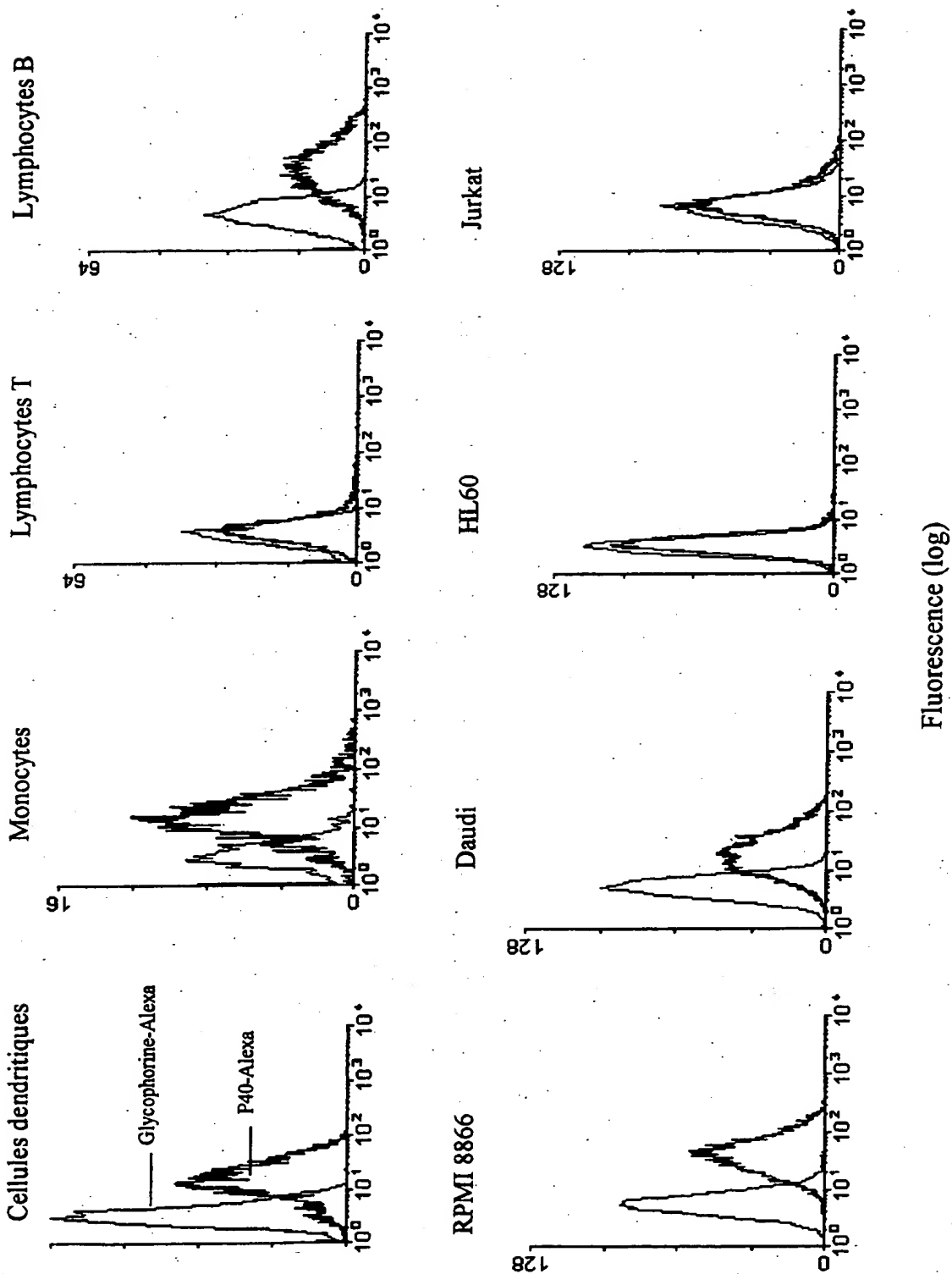


FIGURE 1

2/4

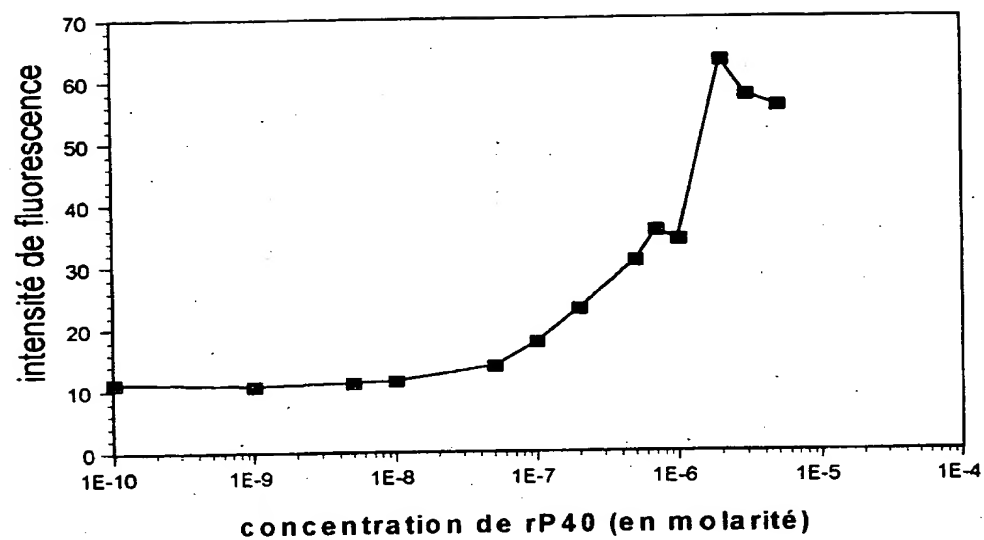


FIGURE 2

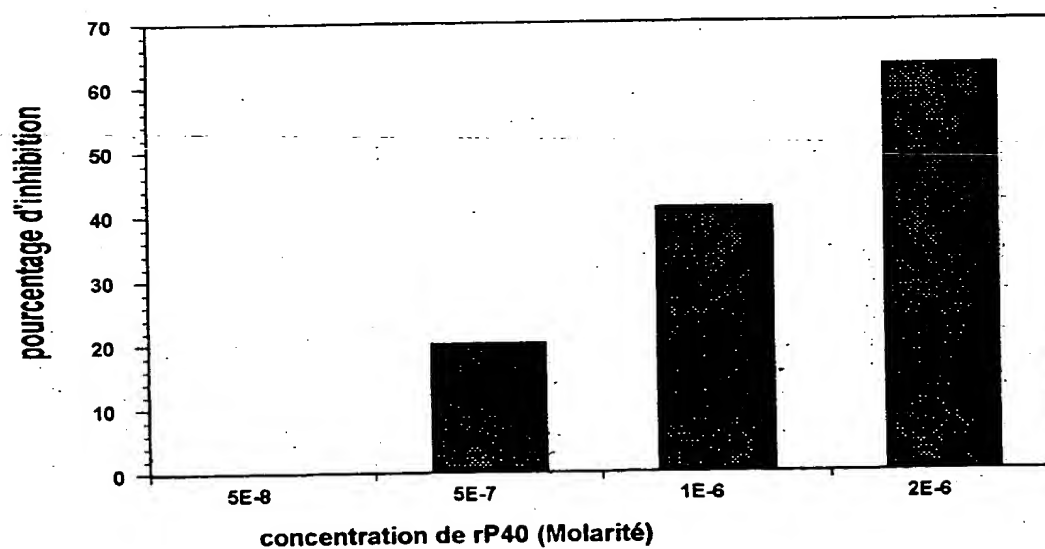


FIGURE 3

3/4

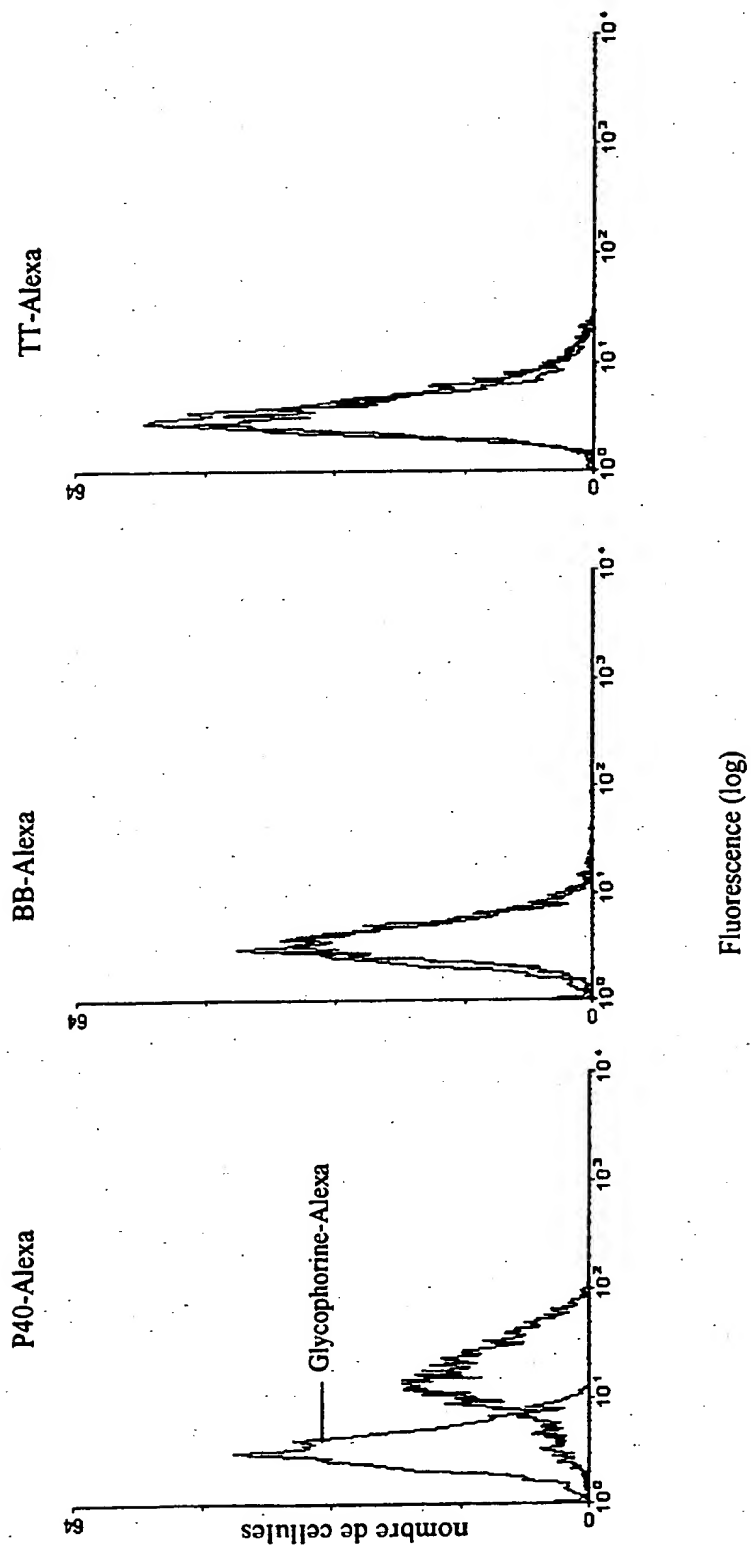


FIGURE 4



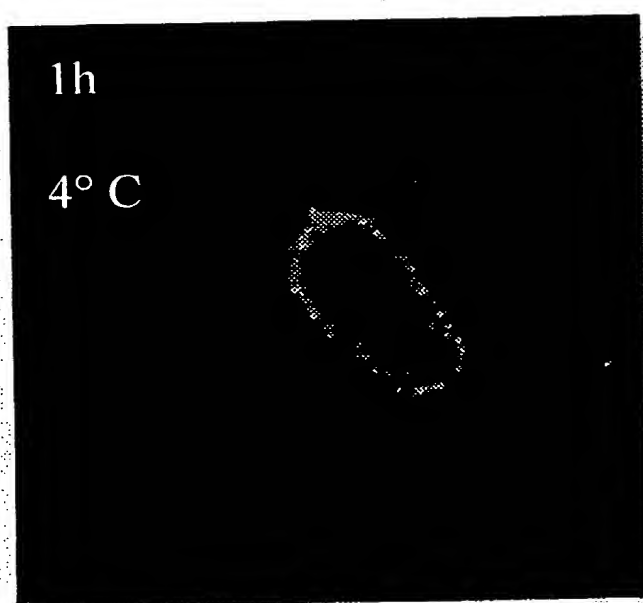


FIGURE 5A

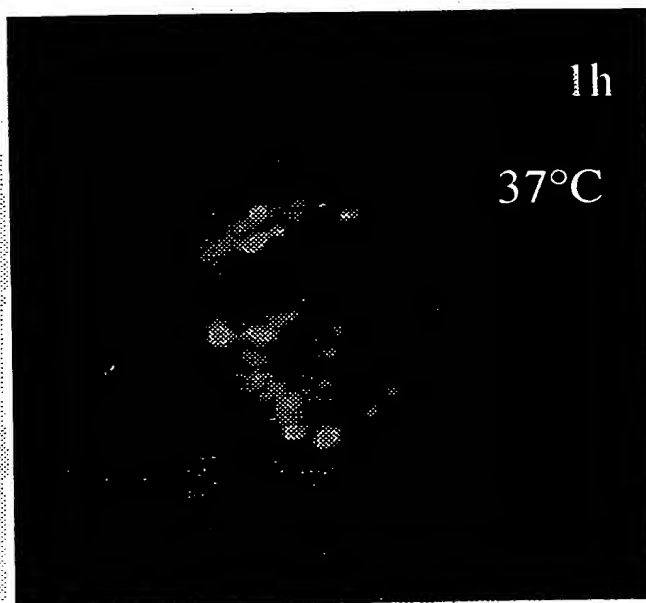


FIGURE 5B

## LISTE DE SÉQUENCES

&lt;110&gt; PIERRE FABRE MÉDICAMENT

<120> UTILISATION D'UNE PROTÉINE OmpA D'ENTÉROBACTÉRIE, POUR  
LE CIBLAGE SPÉCIFIQUE D'UNE SUBSTANCE BIOLOGIQUEMENT  
ACTIVE QUI LUI EST ASSOCIÉE VERS LES CELLULES  
PRÉSENTATRICES D'ANTIGÈNES

&lt;130&gt; D17777

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; FR 98 14007

&lt;151&gt; 1998-11-06

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.2

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1035

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Klebsiella pneumoniae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; exon

&lt;222&gt; (1)..(1032)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; intron

&lt;222&gt; (1033)..(1035)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1032)

&lt;400&gt; 1

atg	aaa	gca	att	ttc	gta	ctg	aat	gcg	gct	ccg	aaa	gat	aac	acc	tgg	48
Met	Lys	Ala	Ile	Phe	Val	Leu	Asn	Ala	Ala	Pro	Lys	Asp	Asn	Thr	Trp	
1				5					10					15		

tat	gca	ggt	ggt	aaa	ctg	ggt	tgg	tcc	cag	tat	cac	gac	acc	ggt	ttc	96
Tyr	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Gly	Trp	Ser	Gln	Tyr	His	Asp	Thr	Gly	Phe	
		20					25						30			

tac	ggt	aac	ggt	ttc	cag	aac	aac	aac	ggt	ccg	acc	cgt	aac	gat	cag	144
Tyr	Gly	Asn	Gly	Phe	Gln	Asn	Asn	Asn	Gly	Pro	Thr	Arg	Asn	Asp	Gln	
		35					40					45				

ctt	ggt	gct	ggt	gcg	ttc	ggt	ggt	tac	cag	gtt	aac	ccg	tac	ctc	ggt	192
Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Phe	Gly	Gly	Tyr	Gln	Val	Asn	Pro	Tyr	Leu	Gly	
	50				55					60						

ttc	gaa	atg	ggt	tat	gac	tgg	ctg	ggc	cgt	atg	gca	tat	aaa	ggc	agc	240
Phe	Glu	Met	Gly	Tyr	Asp	Trp	Leu	Gly	Arg	Met	Ala	Tyr	Lys	Gly	Ser	
	65				70				75					80		

ggt	gac	aac	ggt	gct	ttc	aaa	gct	cag	ggc	gtt	cag	ctg	acc	gct	aaa	288
Val	Asp	Asn	Gly	Ala	Phe	Lys	Ala	Gln	Gly	Val	Gln	Leu	Thr	Ala	Lys	

85								90								95								
ctg	ggt	tac	ccg	atc	act	gac	gat	ctg	gac	atc	tac	acc	cgt	ctg	ggc	336								
Leu	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Asp	Asp	Leu	Asp	Ile	Tyr	Thr	Arg	Leu	Gly									
100								105								110								
ggc	atg	gtt	tgg	cgc	gct	gac	tcc	aaa	ggc	aac	tac	gct	tct	acc	ggc	384								
Gly	Met	Val	Trp	Arg	Ala	Asp	Ser	Lys	Gly	Asn	Tyr	Ala	Ser	Thr	Gly									
115								120								125								
gtt	tcc	cgt	agc	gaa	cac	gac	act	ggc	gtt	tcc	cca	gta	ttt	gct	ggc	432								
Val	Ser	Arg	Ser	Glu	His	Asp	Thr	Gly	Val	Ser	Pro	Val	Phe	Ala	Gly									
130								135								140								
ggc	gta	gag	tgg	gct	gtt	act	cgt	gac	atc	gct	acc	cgt	ctg	gaa	tac	480								
Gly	Val	Glu	Trp	Ala	Val	Thr	Arg	Asp	Ile	Ala	Thr	Arg	Leu	Glu	Tyr									
145								150								155								
cag	tgg	gtt	aac	aac	atc	ggc	gac	gcg	ggc	act	gtg	ggt	acc	cgt	cct	528								
Gln	Trp	Val	Asn	Asn	Ile	Gly	Asp	Ala	Gly	Thr	Val	Gly	Thr	Arg	Pro									
165								170								175								
gat	aac	ggc	atg	ctg	agc	ctg	ggc	gtt	tcc	tac	cgc	ttc	ggt	cag	gaa	576								
Asp	Asn	Gly	Met	Leu	Ser	Leu	Gly	Val	Ser	Tyr	Arg	Phe	Gly	Gln	Glu									
180								185								190								
gat	gct	gca	ccg	gtt	gtt	gct	ccg	gct	ccg	gct	ccg	gct	ccg	gaa	gtg	624								
Asp	Ala	Ala	Pro	Val	Val	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	Val									
195								200								205								
gct	acc	aag	cac	ttc	acc	ctg	aag	tct	gac	gtt	ctg	ttc	aac	ttc	aac	672								
Ala	Thr	Lys	His	Phe	Thr	Leu	Lys	Ser	Asp	Val	Leu	Phe	Asn	Phe	Asn									
210								215								220								
aaa	gct	acc	ctg	aaa	ccg	gaa	ggt	cag	cag	gct	ctg	gat	cag	ctg	tac	720								
Lys	Ala	Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Gly	Gln	Gln	Ala	Leu	Asp	Gln	Leu	Tyr									
225								230								235								
act	cag	ctg	agc	aac	atg	gat	ccg	aaa	gac	ggt	tcc	gct	gtt	gtt	ctg	768								
Thr	Gln	Leu	Ser	Asn	Met	Asp	Pro	Lys	Asp	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Leu									
245								250								255								
ggc	tac	acc	gac	cgc	atc	ggt	tcc	gaa	gct	tac	aac	cag	cag	ctg	tct	816								
Gly	Tyr	Thr	Asp	Arg	Ile	Gly	Ser	Glu	Ala	Tyr	Asn	Gln	Gln	Leu	Ser									
260								265								270								
gag	aaa	cgt	gct	cag	tcc	gtt	gtt	gac	tac	ctg	gtt	gct	aaa	ggc	atc	864								
Glu	Lys	Arg	Ala	Gln	Ser	Val	Val	Asp	Tyr	Leu	Val	Ala	Lys	Gly	Ile									
275								280								285								
ccg	gct	ggc	aaa	atc	tcc	gct	cgc	ggc	atg	ggt	gaa	tcc	aac	ccg	gtt	912								
Pro	Ala	Gly	Lys	Ile	Ser	Ala	Arg	Gly	Met	Gly	Ser	Asn	Pro	Val										
290								295								300								
act	ggc	aac	acc	tgt	gac	aac	gtg	aaa	gct	cgc	gct	gcc	ctg	atc	gat	960								
Thr	Gly	Asn	Thr	Cys	Asp	Asn	Val	Lys	Ala	Arg	Ala	Ala	Leu	Ile	Asp									
305								310								315								
tgc	ctg	gct	ccg	gat	cgt	cgt	gta	gag	atc	gaa	gtt	aaa	ggc	tac	aaa	1008								
Cys	Leu	Ala	Pro	Asp	Arg	Arg	Val	Glu	Ile	Glu	Val	Lys	Gly	Tyr	Lys									
325								330								335								

gaa gtt gta act cag ccg gcg ggt taa  
 Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly  
 340

1035

<210> 2  
 <211> 344  
 <212> PRT  
 <213> *Klebsiella pneumoniae*

<400> 2  
 Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Asn Ala Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp  
 1 5 10 15  
 Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe  
 20 25 30  
 Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln  
 35 40 45  
 Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly  
 50 55 60  
 Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu Gly Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser  
 65 70 75 80  
 Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys  
 85 90 95  
 Leu Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly  
 100 105 110  
 Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly  
 115 120 125  
 Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly  
 130 135 140  
 Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr  
 145 150 155 160  
 Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro  
 165 170 175  
 Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Glu  
 180 185 190  
 Asp Ala Ala Pro Val Val Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Glu Val  
 195 200 205  
 Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys Ser Asp Val Leu Phe Asn Phe Asn  
 210 215 220  
 Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr  
 225 230 235 240  
 Thr Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys Asp Gly Ser Ala Val Val Leu  
 245 250 255  
 Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Gly Ser Glu Ala Tyr Asn Gln Gln Leu Ser

260 265 270

Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val Val Asp Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile  
275 280 285

Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly Met Gly Glu Ser Asn Pro Val  
290 295 300

Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp  
305 310 315 320

Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys  
325 330 335

Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly  
340

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02734

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/385 A61K39/39 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAEUW J F ET AL: "The recombinant Klebsiella pneumoniae outer membrane protein OmpA has carrier properties for conjugated antigenic peptides." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, (1998 JUL 15) 255 (2) 446-54., XP002114947 the whole document ---	1-25
A	WO 97 41210 A (DUKE UNIVERSITY) 6 November 1997 (1997-11-06) the whole document ---	1-25
A	WO 96 14415 A (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 17 May 1996 (1996-05-17) cited in the application the whole document ---	1-25
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 March 2000

Date of mailing of the international search report

22/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02734

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 97 41888 A (PIERRE FABRE MEDICAMENT)  13 November 1997 (1997-11-13)  the whole document  -----</p>	1-25

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02734

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9741210 A	06-11-1997	US 5853719 A	29-12-1998
		AU 2821397 A	19-11-1997
		CA 2253632 A	06-11-1997
		EP 0918848 A	02-06-1999
WO 9614415 A	17-05-1996	FR 2726472 A	10-05-1996
		AU 714423 B	06-01-2000
		AU 4119996 A	31-05-1996
		CA 2204510 A	17-05-1996
		EP 0791063 A	27-08-1997
		JP 10508595 T	25-08-1998
		ZA 9509416 A	06-06-1996
WO 9741888 A	13-11-1997	FR 2748476 A	14-11-1997
		AU 2901997 A	26-11-1997
		BR 9708979 A	03-08-1999
		CA 2254084 A	13-11-1997
		CN 1221348 A	30-06-1999
		EP 0914152 A	12-05-1999



# RAPPORT DE RECHERCHES INTERNATIONALES

Der. Internationale No  
PCT/FR 99/02734

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K39/385 A61K39/39 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	HAEUW J F ET AL: "The recombinant Klebsiella pneumoniae outer membrane protein OmpA has carrier properties for conjugated antigenic peptides." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, (1998 JUL 15) 255 (2) 446-54., XP002114947 le document en entier ---	1-25
A	WO 97 41210 A (DUKE UNIVERSITY) 6 novembre 1997 (1997-11-06) le document en entier ---	1-25
A	WO 96 14415 A (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 17 mai 1996 (1996-05-17) cité dans la demande le document en entier ---	1-25
	-/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 mars 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22/03/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreau, J

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

et le Internationale No

PCT/FR 99/02734

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WO 97 41888 A (PIERRE FABRE MEDICAMENT)  13 novembre 1997 (1997-11-13)  le document en entier  -----</p>	1-25

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De l'Organisation internationale No

PCT/FR 99/02734

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9741210 A	06-11-1997	US 5853719 A	29-12-1998
		AU 2821397 A	19-11-1997
		CA 2253632 A	06-11-1997
		EP 0918848 A	02-06-1999
WO 9614415 A	17-05-1996	FR 2726472 A	10-05-1996
		AU 714423 B	06-01-2000
		AU 4119996 A	31-05-1996
		CA 2204510 A	17-05-1996
		EP 0791063 A	27-08-1997
		JP 10508595 T	25-08-1998
		ZA 9509416 A	06-06-1996
WO 9741888 A	13-11-1997	FR 2748476 A	14-11-1997
		AU 2901997 A	26-11-1997
		BR 9708979 A	03-08-1999
		CA 2254084 A	13-11-1997
		CN 1221348 A	30-06-1999
		EP 0914152 A	12-05-1999

